

# Dört Farklı Saklama Ortamının Avulse Dişler Üzerindeki Etkisinin Hücre Kültürü Metodu İle İncelenmesi

A STUDY ON THE EFFECTS OF 4 DIFFERENT STORAGE MEDIA ON AVULSED TEETH BY USING CELL CULTURE METHOD

Aylin KALAYCI\*, İsmet GÜRKAN

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı kültürlerden elde edilen insan periodontal ligament (PDL) hücrelerinin Hanks's Balanced Salt Solüsyonu (HBSS), süt, serum fizyolojik ve tükürükte bırakıldığında canlılığını koruyabilme özelliğinin araştırılmasıdır.

**Materyal ve Metod:** Hücreler 20 C'de 30 dk, 1, 3, 8, 12, 24, 36, 48, 72 ve 96 saat süreyle bu ortamlarda bekletildi. Hücrelerdeki morfolojik değişiklikler fotoğrafları alınarak incelendi.

**Bulgular:** Çalışmamız sonucunda HBSS'de 96 saat sonra PDL hücrelerinin % 50'ye yakını sağlıklı ve tablolarda bağlı kaldı ve saklama ortamı olarak en iyi sonuçlar HBSS ile elde edildi. Süt de uygun bir saklama ortamı idi ve 72 saat sonra %50'ye yakın hücrenin canlı ve sağlıklı olduğu saptandı. Serum fizyolojik ile muamele edilen PDL hücrelerinin 12 saatte yalnızca %25'i tablolarda bağlı kaldı.

**Sonuç:** Sonuç olarak oda ısısında HBSS ve sütün PDL hücrelerini saklamak için uygun bir ortam olduğu, fakat tükürüğün uygun bir ortam olmadığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Avulse dişler, Saklama ortamı

## GİRİŞ

Travma sonucunda dişlerin alveol soketinden dışarı çıktığı sıklıkla görülmektedir (Avulsiyon) (1-3). Avulse dişlerin periodontal ligament hücrelerinin canlılığının korunması, reimplantasyonun başarısını etkilemektedir (3-12). Travmadan sonra çok az diş alveol soketi içine hemen yerleştirilebilmektedir (3,7,13). Bu nedenle avulse dişin periodontal ligament hücrelerinin uzun süre canlılığının korunduğu bir ortamda dikkatlice tutularak diş hekimine götürülmesi büyük önem taşımaktadır (3,5,7,8,10).

Reimplantasyonunun başarısını etkileyen faktörlerin başında alveol soketinin durumu ve avulse dişte herhangi bir periodontal hastalığın bulunmaması, ikincisi dişin yerleştirileceği bölgede kemik kaybının fazla olmaması, üçüncüsü saklanma ve diş hekimine götürülme ortamı, dördüncüsü de diş hekimine gidene kadar dişin elle tutularak nasıl taşınacağıdır. Kazadan sonra dişler kron kısmından tutulmalı, kök bölgesinden tutulmadan muhafaza ortamına yerleştirilmelidir (13).

Soketinden çıkmış olan dişlerin diş hekimine ulaşmaya kadar çeşitli solüsyonlar içerisinde saklanması

\* ALI Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir,

\* Dr.Dt.A.O. Diş Hek.Fak.Endodonti B.D. Araş.Gör.

\*\* Uz.Dr.Şap Enstitüsü Araştırma ve Kontrol Bölüm Başkanı

## SUMMARY

**Purpose:** The purpose of this study was to compare the viability of cultured human periodontal ligament (PDL) cells in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), milk, saline and saliva.

**Material and Method:** Cells were exposed to media for 30 min, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours at 20 C. The morphological changes were examined and photographs taken.

**Results:** Our results showed that HBSS gave the best result as a storage medium for PDL cells since 50% of cells were healthy and attached after 96 h. Milk was a suitable medium and 50% PDL cells remained healthy and attached for 72 h. 25% of PDL cells in saline remained attached to the plates for only 12 h.

**Conclusion:** We concluded that at room temperature HBSS and milk were suitable however saliva was not a suitable storage media for PDL cells.

**Key Words:** Avulsed teeth, Storage media

önerilmektedir (3,5,7,8,10-15). Böylece uygun şekilde yapılan transport periodontal ligament hücrelerinin uzun süre canlılığını korumasına yardımcı olmaktadır. Bugüne kadar süt, serum fizyolojik, tükürük, musluk suyu v.b. transport solüsyonu olarak kullanılmıştır .1994' de Amerikan Assosiation of Endodontists tarafından acilen reimplante edilemeyen avulse dişlerin transportasyonunda en uygun ortam olarak Hanks Balanced Salt Solüsyonu tavsiye edilmiştir .Eğer HBSS yoksa, ikinci derecede süt, üçüncü olarak serum fizyolojik, dördüncü olarak tükürük ve su kullanılabilirliği bildirilmiştir (13).

Sütün yağsız olduğu ve pastörize olduğunda periodontal ligament hücrelerini depolamak için iyi bir ortam oluşturduğu bildirilmiştir. Sütün ozmatik basıncı (250 mOsm/kg) ve pH (6,5-6,8) dir. Sütün periodontal ligament hücrelerinin canlılığını koruyabilmek için besleyici esas maddeleride içerdiği saptanmıştır(3,8,16). Serum fizyolojinin ozmotik basıncı (280 mOsm/kg), tükürük ozmotik basıncı (60-80 mOsm/kg) olup hipotonik bir solüsyondur. HBSS'nin ozmotik basıncı 270 mOsm/kg.dır (3).

Transporte edilecek diş asla gazlı bezle tutulmamalıdır (13).

Bu çalışmada Hanks Balanced Salt Solüsyonu, pastörize süt, serum fizyolojik ve tükürük ile periodontal ligament hücreleri 1/2, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 ve 96 saat

Tablo 1. Farklı sürelerde farklı solüsyonlür ile muamele edilen Hücrelerin Canlı kalma skorları

SAAT	HBSS	SÜT	SERUM FİZYOLOJİK	TÜKÜRÜK
1/2	++++	++++	++++	+++ -
1	++++	++++	+++ -	++ - -
3	++++	++++	++ - -	+ - - -
6	++++	++++	+ - - -	- - - -
12	++++	++++	- - - -	- - - -
24	++++	+++ -	- - - -	- - - -
36	+++ -	+++ -	- - - -	- - - -
48	+++ -	++ - -	- - - -	- - - -
72	++ - -	++ - -	- - - -	- - - -
96	+ - - -	+ - - -	- - - -	- - - -

süreyle muamele edilerek sitotoksitelerinin incelenmesi amaçlandı.

### MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonundan alınan sağlıklı çekilmiş insan daimi dişlerinden elde edilen periodontal ligament fibroblast hücreleri kullanıldı. Sıvı azottan çıkartılan 1 ml hücre süspansiyonu %10 fetal dana serum (FSC:Biochrom, Almanya) içeren antibiyotiksiz a- MEM\* (üretim vasatı) içerisinde homojenize edildi ve 25 cm<sup>2</sup> yüzeyli hücre kültürü flaksına (Greiner, Almanya) konularak 37°C de inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonunda %90-95 monolayer olan hücrelerin tripsin-EDTA solüsyonu ile yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlandı, üretim vasatı ile homojenize edilerek çok kuyucuklu ve 24 bölmeli doku kültürü tablalarına (Greiner, cloning plate, Almanya) geçirildi. 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ile %95 hava içeren rutubetli ortamda 48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda üretim vasatı aspire edildi, 44 bölme/ test solüsyonu ile bir bez yıkandıktan sonra (üretim vasatının ortamdaki tamamen uzaklaştırılması amacı ile) ilgili bölmelere test solüsyonları (1 ml/bölme) konuldu ve oda ısısında bekletildi (20°C). Test solüsyonu olarak HBSS\*\*, Süt\*\*\*, Serum Fizyolojik\*\*\*\* ve Tükürük\*\*\*\*\* kullanıldı. Test solüsyonları 6-8 saatte bir değiştirildi. 1/2, 1,3,6,12,24, 36,48,72 ve 96 saatlerde bu solüsyonlarla muamele edilen hücrelerdeki morfolojik değişiklikler inverted faz kontrast mikroskopu\*\*\*\*\* ile incelendi ve mikrofotografi ile tespit edildi. Her numune için kültür kabı yüzeyinin farklı bölgelerinden 5 ayrı fotoğraf çekildi. Görüntünün netleştirilebilmesi amacı ile süt içeren bölmeler, değerlendirme öncesinde 3-4 kez HBSS ile yıkandı. 96 saat sonunda kalan canlı hücrelerin üreme özelliklerini koruduklarını belirlemek amacı ile, içerdikleri test solüsyonları aspire edildi ve üretim vasatına konularak 37°C de, %5 CO<sub>2</sub>, %95 hava içeren rutubetli etüvde 96 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda mikroskopik inceleme ve mikrofotografileri alınarak değerlendirmeleri yapıldı.

a-MEM (Biological Industries İsrail)  
HBSS (Hanks's Balanced Salt Solution)  
Pınar, Türkiye

\* % 0,9 NaOCl solüsyonu

\*\* Parafin çignetilerek tek bireyden steril olarak elde edildi.

\*\*\* Zeiss Axiovert, Germany

### BULGULAR

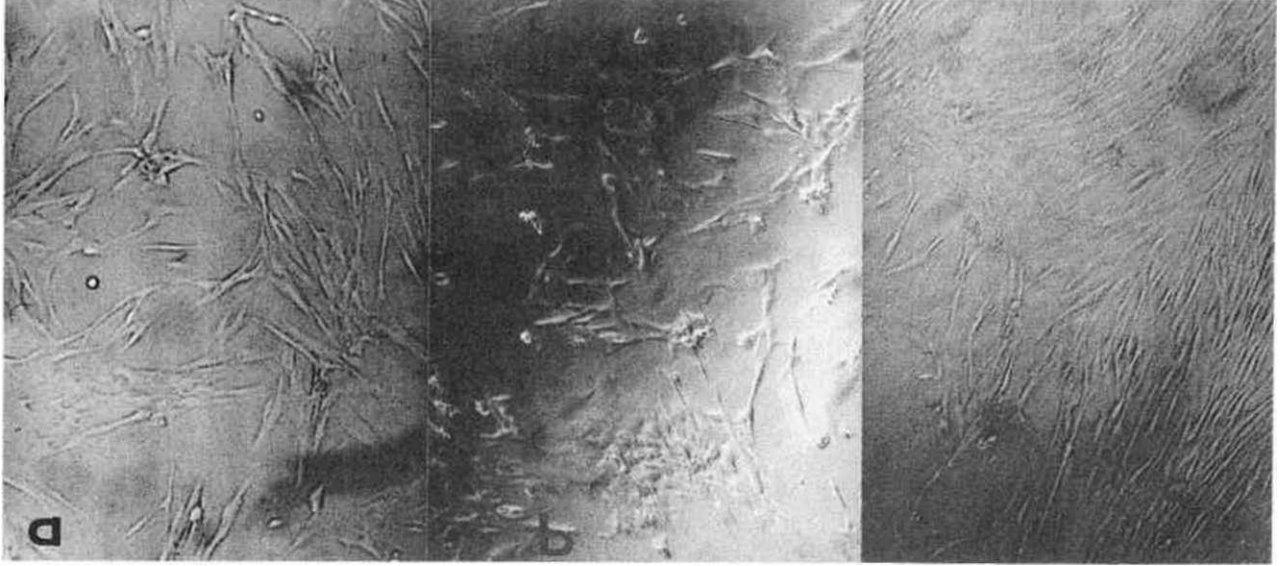
Elde edilen periodontal ügament hücreleri HBSS, süt, serum fizyolojik ve tükürük ile 1/2, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 ve 96 saat süreyle muamele edildikten sonra tablalarda canlı kalan hücrelerin miktarı aşağıdaki gibi skorlandı (Tablo 1).

- ++++ Hücrelerin tümü normal morfolojide ve herhangi bir toksik etki gözlenmedi.
- +++ - Hücrelerin % 75'i normal morfolojik özellikte, % 25'inde dejenerasyon mevcut.
- ++ - Hücrelerin % 50'ye yakınında morfolojik olarak canlı %50'ye yakınında sitotoksik özellik gözlemlendi.
- + - Hücrelerin % 75'inde toksik etki
- Hücrelerin tamamında sitotoksik etki gözlemlendi ve hücreler tablalardan ayrıldı ve öldü.

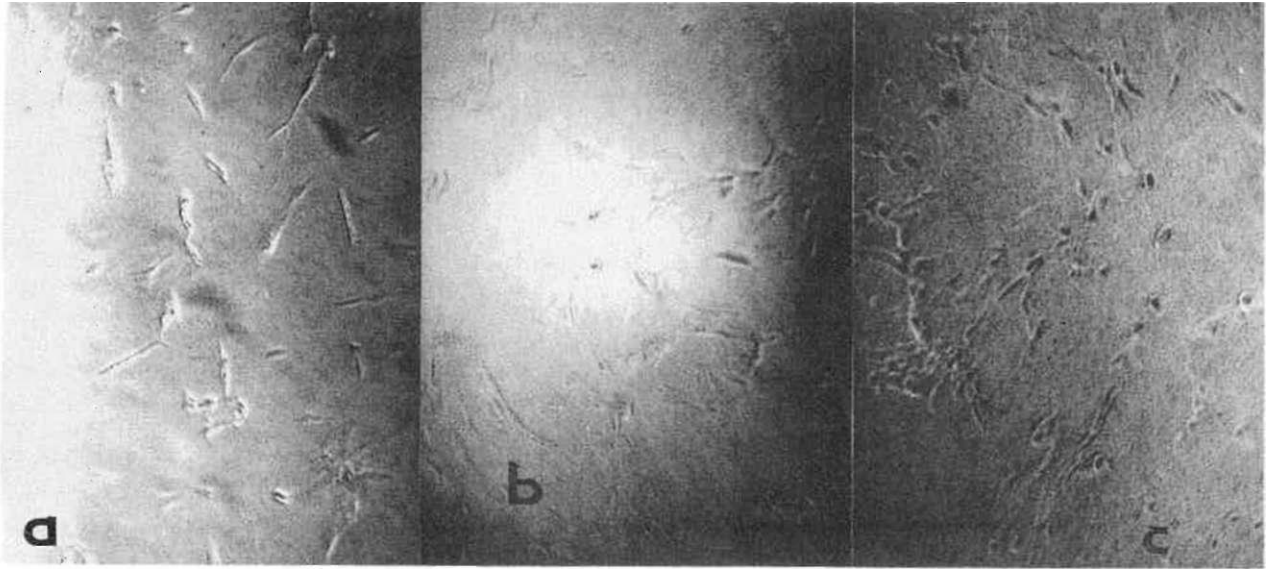
Solüsyonların tümü deney esnasında oda ısısında periodontal ügament hücreleri ile temas ettirildi. HBSS ile muamele edilen PDL hücrelerinde 36 saat sonunda bile normal morfolojik özellikler saptanarak herhangi bir toksik etki görülmedi. 48 saat sonunda da hücreler canlı idi ve morfolojik özelliklerini korudu. 72 ve 96 saat sonunda tablalardaki mevcut hücrelerin %50'sinin canlı olduğu saptandı. 96 saat sonunda hücrelerin hala tekrar çoğalma kabiliyetlerinin olup olmadığına ayrıca bakıldı. Kalan hücreler a-MEM içerisine tekrar konularak, bu hücrelerin çoğalma kabiliyetlerinin devam ettiği gözlemlendi (Resim 1 a-b-c).

Süt ile muamele edilen PDL hücrelerinin 24 saate kadar tablalarda canlı kaldığı ve morfolojik özelliklerinin bozulmadığı tespit edildi. Sütün PDL hücreleri için sitotoksik etki göstermediği izlendi. 48. ve 72. saatlerde tablalardaki canlı hücrelerin %50'ye yakınında normal morfolojik özellikte olduğu, 96 saat sonunda tablalarda HBSS kadar oimasada canlı hücrelerin varlığı gözlemlendi. Ayrıca bu kalan canlı hücreler 96 saat sonra tekrar a-MEM içerisine konuldu ve hücrelerin çoğalma yeteneğinin devam ettiği görüldü (Resim 2a-b-c).

Serum fizyolojik ile temas ettirilen PDL hücrelerinde ilk yarım saatte herhangi bir bozulma etkisi gözlenmedi. 1. saat sonunda hücrelerde hafif dejenerasyonlar başladı, 3. saat sonunda az sayıda hücrede yuvarlaklaş-



Resim 1. Inverted faz kontrast mikroskopunda HBSS ile muamele edilen PDL hücreleri a)6 saat sonra b)36 saat sonra izlenmekte c)96 saat sonra kalan canlı hücrelerin tekrar çoğalma yeteneğinin olduğu görülüyor.



Resim 2. inverted faz kontrast mikroskopunda Süt ile temas eden PDL hücreleri a)6 saat sonra b)12 saat sonra c)24 saat sonra alınan fotoğraflar.

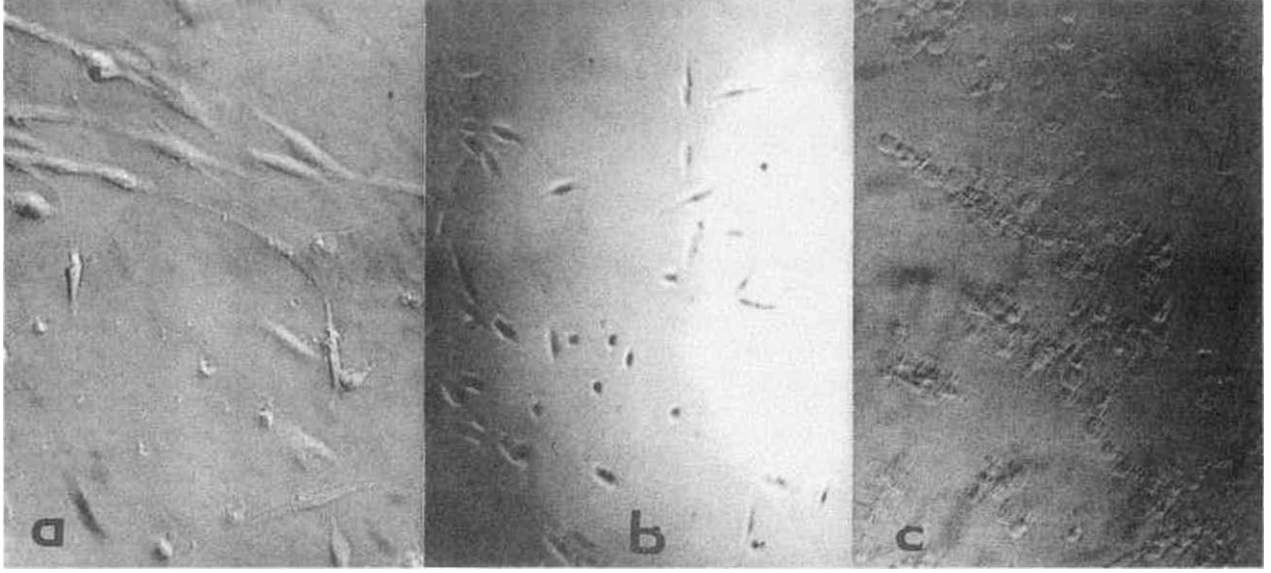
malar görüldü.6. saat sonunda bu yuvarlaklaşmalar yavaş yavaş devam etti. 12. saatte yine tablalarda hücre mevcut ancak yuvarlaklaşma hala devam ediyordu. 24.saat sonunda hücreler iyice bozuldu ve sitotoksik etki görüldü. 36. ve 48. saatte tamamen dejenere olan hücreler tablalardan ayrıldı (Resim 3 a-b-c).

Tükürükle bırakılan hücrelerde ilk yarım saat içerisinde hücrelerde toplanmalar saptandı. 1. saat sonunda çok sayıda hücrede morfolojik değişiklikler mevcuttu ve yuvarlaklaşmaların hızlı bir şekilde devam ettiği

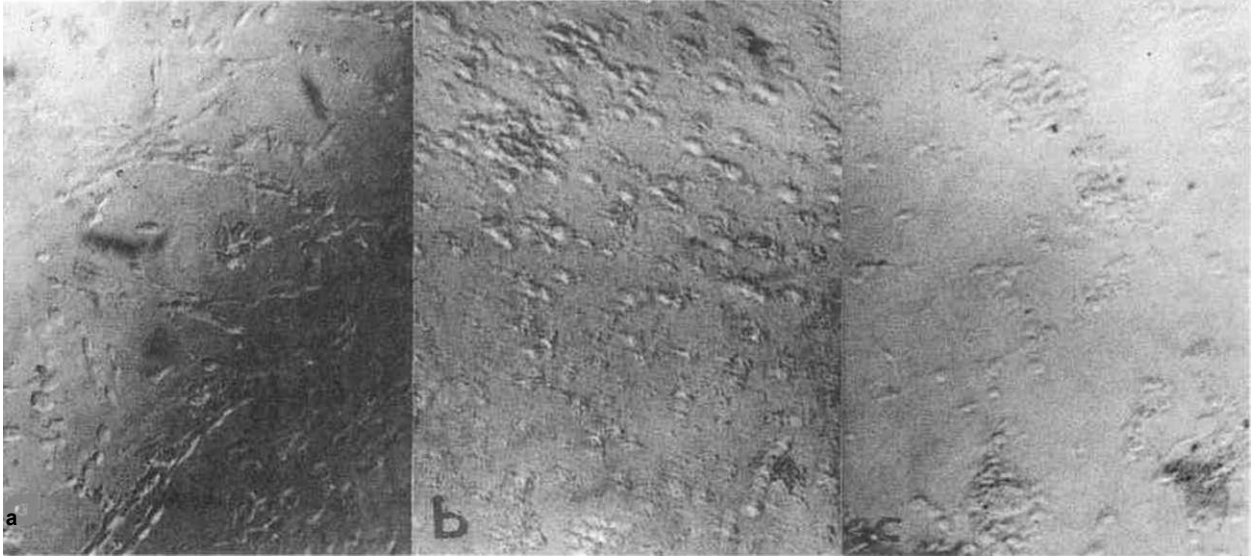
gözlemlendi. 3 .saat sonra dejenerasyonda artma hücrelerde, kenarlarda toplanma ve yüzeyden ayrılma vardı. 6.saatte hücreler iyice yuvarlaklaşmıştı. 12.saatten sonra tüm hücrelerde dejenerasyonlar vardı ve hiç canlı hücre kalmamıştı (Resim 4a-b-c).

#### TARTIŞMA

Bu çalışmada Huang ve ark'nın (3) çalışmalarında olduğu gibi PDL fibroblast hücreler kullanıldı. Bağ dokusunun oluşumu ve üretiminden büyük oranda so-



Resim 3. Serum fizyolojik ile muamele edilen PDL hücreleri a)1/2 saat sonra b)3 saat sonra c)24 saat sonra (yuvarlak hale gelen ve toplanan dejenere hücreler).



Resim 4. Tükürükle muamele edilen PDL hücreleri a)1/2 saat sonra (hücrelerde toplanmalar başlamış) b)1 saat sonra (hücrelerde yuvarlaklaşmalar ve dejenerasyon izleniyor) c)12 saat sonra (hücreler tamamen dejenere olmuş ve toplanmalar mevcut).

rumlu olan fibroblastların, PDL dokusunda kollagenin, kollagen olmayan proteine dönüşmesinde ve sentezinde büyük rol oynadığı, ayrıca bu hücrelerin kökü ankiloza karşı koruduğu bildirilmiştir (3),

Avulse dişlerin kök yüzeyinde mevcut periodontal ligament hücrelerinin canlılığının korunması reimplante bir dişin prognozunun saptanmasında en önemli faktörlerden birisidir, acil işlemin avulse dişin zaman geçirmeden soketi içine yerleştirilmesi olduğu bildirilmiştir (1,3,5,7,8,13). Avulse dişlerin hemen soketi içine yerleştirilmesi her zaman mümkün olmamakta ve belirli bir

süre geçmektedir. Bu nedenle çalışmamızda PDL hücreleri farklı zaman periyotlarında, kullandığımız farklı solüsyonlarla muamele edildi.

Huang ve ark. (3) çekilmiş sağlıklı insan dişlerinden elde ettikleri PDL hücrelerini süt, serum fizyolojik, HBSS solüsyonu ve kontakt lens solüsyonları ile 0, 1, 3, 6, 10, 16, 24, 36, 72 ve 96 saat süreyle muamele etmişlerdir. Sütün kısa zaman periyodunda en iyi saklama ortamı olduğunu, 72 saat sonra HBSS 'de saklanan hücrelerin %46,8'inin canlılığını koruduğunu bildirmişlerdir, 96 saat sonunda hiçbir depolama ortamında hücre bağlanması

görememişlerdir. Çalışmamız sonucunda HBSS ile muamele edilen hücrelerin 24 saat süreyle tamamının canlı kaldığı, 36. saatte çok az hücrede morfolojik değişikliklere rastlandığını 96 saat sonunda da hücrelerin tablalara bağlı kaldığını ve yarıya yakınının tekrar çoğalma kabiliyetinin olduğunu saptadık. Süt ile temas eden grupta da 12 saat süreyle hücrelerin canlı olduğu görüldü. 36, 48, 72 ve 96 saat sonra hücrelerin canlılığını yitirmediği gözlemlendi. Serum fizyolojik grubunda ilk yarım saatte en iyi sonuçlar alınırken 1. saatte başlayan morfolojik değişikliklerin 3, 6 ve 12. saatlerde yavaş yavaş arttığı gözlemlendi ve 24 saatte hiç canlı hücre kalmadığı tespit edildi. Tükürük ile temas ettirilen grupta ilk yarım saatte başlayan hücre dejenerasyonu 1, 3, 6. saatlerde hızla artarak devam etmiş ve 12. saatte tablalardan tamamen ayrılan hücrelerin canlılığını yitirdiği tespit edildi. Bu sonuçlar Huang ve arkadaşlarının çalışmaları ile paralellik göstermesine rağmen bulgular arasındaki farklılıklar, bizim deney esnasında tüm solüsyonları oda ısısında kullanmış olmamızdan kaynaklanabilir. Pratikte de her an farklı ısı derecelerinde solüsyonları temin etmek zordur.

Blömlöf ve ark (5) endodontik tedavi görmüş çekilmiş maymun dişlerini süt ve tükürükte 2 ve 6 saat beklettikten sonra reimplante etmişler ve 8 hafta sonra periodontal dokuları histolojik olarak incelemişlerdir. 2 ve 6 saat süte ve 2 saat tükürükte bekletildiğinde hemen hemen acilen reimplante edilen dişlerdeki gibi periodontal dokuların sağlıklı olduğunu tespit etmişlerdir. Dişler tükürükte 6 saat ve 1 saat açıkta kurduğu zaman replasman rezorpsiyonu görüldüğünü saptamışlardır. Sütün acilen reimplante edilemeyen avulse dişlerin reimplantasyondan önce saklanabileceği iyi bir ortam olduğunu belirtmişlerdir. Yine bu araştırmacılar salivanın bakteri içeriğinin süten daha fazla olduğunu periodontal ligament hücrelerinin enfeksiyonuna neden olarak zarar verdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca tükürükte depolanan periodontal ligament hücrelerine bakterilerin süten daha fazla bağlandığını, bakteriyel bağlanmanın virülen bir faktör oluştuğunu, uzun süre tükürükte depolamanın zararlı etkileri olduğunu da belirtmişlerdir. Bu araştırmacıların sonuçları da çalışmamızla paralellik göstermesine rağmen ilk 2 saatte tükürükte, bize göre daha iyi sonuçlar bildirmeleri, onların değerlendirme yönteminin farklılığı ve in vivo bir çalışma olmasından kaynaklanabilir.

HBSS'nin pH ve ideal ozmolitesi ile 24 saat süre ile periodontal ligament hücrelerinin canlılığını korumak için biyolojik olarak uyumlu olduğu belirtilmiştir (3,13). Araştırmacılar reimplantasyondan önce 30 dakika süre ile avulse dişlerin HBSS içine konduğunda, dejenere olan periodontal ligament hücrelerinin yenilenmesi için uygun bir ortam oluşturacağını bildirmişlerdir (13). Bizim çalışmamızda da tüm zaman periyotlarında en iyi sonuçlar HBSS ile alınmıştır.

Bu solüsyonun steril bir cam kap içinde saklanabileceği, soğutmanın gerekli olmadığı bildirilmiştir (13). Avulse dişleri transport etmek için iyi bir ortam olması nedeniyle HBSS, okullarda, evlerde, spor eğitim merkezlerinde, eczanelerde, arabalarda ilk yardım çantasında bir cam kap içerisinde bulundurulabilir.

## SONUÇ

1- Reimplante bir dişin prognozunu belirleyen en önemli faktörlerden birisi avulse dişin kök yüzeyinde kalan periodontal ligament hücrelerinin canlılığıdır.

2- Avulse dişleri travmadan sonra mümkün olan en kısa sürede reimplante etmekle en iyi sonuçlar alınabilir.

3- Çalışmamız sonucunda HBSS acilen reimplante edilemeyen dişleri en iyi saklama ortamı olarak saptandı.

4- Süt temini en kolay olması nedeniyle HBSS'den sonra PDL hücrelerinin canlılığını korumak için iyi bir ortamdır,

5- Serum fizyolojik ve tükürük uzun süreli depolama solüsyonu olarak tercih edilmemelidir.

## KAYNAKLAR

- Abbott PV: Self-replantation of an avulsed tooth. 30-year follow-up. *Int Endod J* 23:36, 1991
- Kawashima Z, Pineda R: Replanting Avulsed Primary Teeth. *JADA* 123:90, 1992
- Huang S-C, Remeikis NA, Daniel JC: Effects of Long-Term Exposure of Human Periodontal Ligament Cells to Milk and Other Solutions. *J Endodon* 22:30, 1992
- Andreasen JO: Relationship between surface and inflammatory resorption and pathological changes in the pulp after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endodon* 7:294, 1981
- Blömlöf L, Lindskog S, Andersson L, Hedström KG, Hammarström L: Storage of Experimentally Avulsed Teeth in Milk Prior to Replantation. *J Dent Res* 62:912, 1983
- Berude JA, Hicks ML, Sauber JJ, Shou-Hua Li: Resorption after Physiological and Rigid Splinting of Replanted Permanent Incisors in Monkeys. *J Endodon* 14:592, 1988
- Dumsha TC: Management of Avulsions. *Dent Clin North Am* 36:425, 1992
- Nordenvall K-J: Milk as storage medium for exarticulated teeth: Report of case. *J Dent Child* 59:150, 1992
- Trope M, Yeşilsoy C, Karen L, Moshonov J, Friedman S: Effects of Different Endodontic Treatment Protocols on Periodontal Repair and Root Resorption of Replanted Dog Teeth. *J Endodon* 18:492, 1992
- Patel S, Dumsha TC, Sydiskis RJ: Determining periodontal ligament (PDL) cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. *Int End J* 27:1, 1994
- Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM: Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4- Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol* 11:76, 1995
- Trope M: Clinical management of the avulsed tooth. *Dent Clin North Am* 39:93, 1995
- American Association of Endodontists: Treatment of avulsed tooth. Recommended Guidelines of the American Association of Endodontists Today 1994
- Oswald RJ, Harrington GW, Van Hassel HJ: A postreplantation evaluation of air-dried and saliva-stored avulsed teeth. *J Endodon* 6:546, 1980
- Mackie IC, Worthington HV: An investigation of replantation of traumatically avulsed permanent incisor teeth. *Br Dent J* 172:17, 1992
- Blömlöf L: Storage of human periodontal ligament cells in a combination of different media. *J Dent Res* 60:1904, 1981

Yazışma Adresi: Dr. Aylin KALAYCI

A.Ü. Diş Hek. Fak. Diş Hastalıkları

ve Ted. Ab.D, Endodonti BD Beşevler/ANKARA